

外源谷胱甘肽对青花菜硫代葡萄糖苷合成的影响

陈芳珍, 张文霞, 唐晨晨, 李维欢, 武志健, 王军伟, 吴秋云, 黄 科

(蔬菜生物学湖南省重点实验室·园艺作物种质创新与新品种选育教育部工程研究中心·农业农村部
园艺作物基因资源评价利用重点实验室·湖南农业大学园艺学院 长沙 410128)

摘 要: 为探究谷胱甘肽对硫代葡萄糖苷(GSLs)生物合成的影响,以现蕾期青花菜品种耐寒优秀为试验材料,研究不同浓度的还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)及丁硫堇(BSO)对青花菜花球中硫代葡萄糖苷及其相关底物含量、酶活性和基因表达的影响。结果表明,与CK(蒸馏水)相比,5 mg·L⁻¹ GSH在处理48 h显著提高了青花菜花球中总硫苷、脂肪族硫苷含量,在24~48 h显著提高半胱氨酸(Cys)含量,在6~24 h显著提高了谷胱甘肽含量,在3~12 h显著提高了硫苷合成相关基因的表达量;45 mg·L⁻¹ GSH处理在48 h显著降低了青花菜花球中总硫苷、脂肪族硫苷含量,在3~48 h则显著提高了半胱氨酸含量,在6~48 h则显著提高了谷胱甘肽含量,在3~12 h显著抑制了硫苷合成相关基因的表达。与CK相比,5 mg·L⁻¹ GSSG处理下青花菜花球中总硫苷、脂肪族硫苷含量显著升高,而25、45及65 mg·L⁻¹ GSSG处理则对总硫苷、脂肪族硫苷含量没有产生显著影响。综上所述,外源谷胱甘肽对硫苷含量的影响具有浓度效应,5 mg·L⁻¹ GSH促进硫苷合成,45 mg·L⁻¹ GSH抑制硫苷合成。

关键词: 青花菜;硫代葡萄糖苷;谷胱甘肽(GSH);酶活性;基因表达

中图分类号: S635.9

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)02-052-09

Effect of exogenous glutathione on the synthesis of glucosinolates in broccoli

CHEN Fangzhen, ZHANG Wenxia, TANG Chenchen, LI Weihuan, WU Zhijian, WANG Junwei, WU Qiuyun, HUANG Ke

(Hunan Provincial Key Laboratory of Vegetable Biology/Engineering Research Center for Horticultural Crop Germplasm Innovation and New Variety Selection and Breeding, Ministry of Education/Key Laboratory for Evaluation and Utilization of Horticultural Crop Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China)

Abstract: To investigate the effects of glutathione (GSH) on glucosinolate (GSLs) biosynthesis, the effects of different concentrations of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (glutathione disulfide; GSSG), and glutathione inhibitor (BSO) were studied on the content of glucosinolate and related substrates, enzyme activity, and gene expression in broccoli floret, using the broccoli variety Naihanyouxu at the budding stage as experimental material. The results showed that, compared to CK, the 5 mg·L⁻¹ GSH treatment significantly increased the total GSL and aliphatic GSL content in broccoli floret at 48 h. It significantly increased cysteine (Cys) content at 24-48 h, significantly increased glutathione content at 6-24 h, and significantly increased the expression of genes related to GSLs biosynthesis at 3-12 h. The 45 mg·L⁻¹ GSH treatment significantly reduced the total GSL and aliphatic GSL content in the broccoli floret at 48 h, while significantly increasing cysteine content at 3-48 h and glutathione content at 6-48 h, and significantly inhibiting the expression of genes related to GSLs biosynthesis at 3-12 h. When compared with CK, the treatment with 5 mg·L⁻¹ GSSG resulted in a significant increase in the content of total GSL, aliphatic GSL in broccoli floret, while treatments with 25, 45, and 65 mg·L⁻¹ GSSG had no effect on the content of total GSL, aliphatic GSL. In conclusion, exogenous glutathione has a concentration effect on the GSLs content, with low concentrations promoting GSLs biosynthesis while high concentrations inhibiting GSLs biosynthesis.

Key words: Broccoli; Glucosinolate; Glutathione(GSH); Enzyme activity; Gene expression

收稿日期: 2023-09-01; 修回日期: 2023-12-08

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF1003000); 国家自然科学基金(32372682, 32272747, 32072585, 32072568); 国家重点研发计划国际合作项目金(2022YFE0108300)

作者简介: 陈芳珍, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为蔬菜分子育种。E-mail: 1948638697@qq.com

通信作者: 黄 科, 男, 教授, 研究方向为十字花科蔬菜分子育种。E-mail: huangkeqy@hotmail.com

青花菜(*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck.)为十字花科芸薹属甘蓝种蔬菜,含有丰富的膳食纤维、矿物质和植物活性物质硫代葡萄糖苷^[1],且具有预防癌症的效果,经常食用青花菜可以降低患有多种慢性疾病的风险^[2-4],因此市场需求逐年增加,在蔬菜周年供应中占有越来越重要的地位。

硫代葡萄糖苷(简称硫苷, glucosinolates, GSLs),是一类富含氮、硫元素的次生代谢产物,主要存在于十字花科植物中^[5]。到目前为止,已鉴定的硫苷种类约130种^[6],硫苷生物合成前体物质来源于丙氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸和苯丙氨酸,根据前体氨基酸的不同可分为脂肪族硫苷、吲哚族硫苷和芳香族硫苷^[7-8]。植物中硫苷生物合成包括3个关键步骤:前体氨基酸的侧链延伸、核心结构的构建以及侧链的二次修饰^[9-10]。其核心结构的形成和代谢途径的主要基因都已被鉴定^[10-11]。简而言之,前体氨基酸被CYP79家族的细胞色素P450转化为醛肟,其中CYP79B2催化色氨酸吲哚-3-乙醛肟,CYP79F1转化所有长链型甲硫氨酸衍生物^[12-13]。接下来,醛肟被CYP83家族的细胞色素P450氧化为活性化合物(氧化腈或酸式硝基化合物),活化的醛肟在多功能酶GSTs的作用下与硫供体(Cys或GSH)结合生成s-烷基硫代氢腈酸盐,其中GSTF11和GSTU20催化脂肪硫苷合成,GSTF9和GSTF10催化吲哚硫苷合成^[14-15],当以GSH为硫供体时,硝基化合物与GSH的共轭物还要在 γ -谷酰基水解酶(GGP1)的水解作用下才能进入下一步反应。s-烷基硫代氢腈酸盐通过C-S裂解酶SUR1转化为硫代氢腈酸^[16],其在UGT74家族的葡萄糖基转移酶和硫转移酶的作用下形成脱硫葡萄糖苷,其中UGT74B1被证明能代谢苯丙氨酸的衍生物,UGT74C1在脂肪硫苷生物合成中起作用^[17-18]。脱硫硫苷在磺基转移酶ST的作用下硫酸化形成完整的硫苷核心结构。

谷胱甘肽(glutathione, GSH)是一种由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽^[19],以GSH(还原型)和GSSG(氧化型)存在植物体内,其中以GSH为主,且只有GSH具有生理活性^[20]。GSH被称为“主要抗氧化剂”,可直接或者间接参与植物活性氧(ROS)清除^[21]。影响谷胱甘肽合成的因素有很多,但最重要的是 γ -谷酰基半胱氨酸合成酶(γ -ECS)活性和半胱氨酸(Cys)浓度, γ -ECS是GSH合成的限速酶(由GSH1编码),其活性受到细胞内GSH浓度的反馈抑制,当GSH浓度过高时,GSH与 γ -ECS的

调节位点结合,使活性中心变构失活,从而抑制GSH的合成。谷胱甘肽与GSLs合成的关系主要有2个方面:一方面是,谷胱甘肽可作为GSLs合成的还原性硫供体;另一方面是,谷胱甘肽通过调节初级硫代谢间接影响GSLs的合成^[22-23]。已有研究发现,外源GSH处理优先激活抗性系统提高植物抗氧化能力,抑制GSLs合成^[24]。然而,外源谷胱甘肽对硫苷合成调控机制的研究报道较少。因此,笔者研究的目的是通过测定硫代葡萄糖苷的组分和含量、硫苷合成过程中关键基因的表达量、GSH的含量和GSH1、GSH2的表达,初步分析GSH影响青花菜硫苷合成的主要途径。

1 材料与方法

1.1 材料

供试青花菜品种为耐寒优秀,种子购自高华种子有限公司。试验于2022年12月至2023年2月在湖南农业大学蔬菜科研基地进行。选取饱满一致的种子播种于装有育苗基质的50穴育苗盘中育苗。待幼苗生长至4片真叶时,将植株定植在装有育苗基质的栽培袋中置于塑料大棚内。青花菜植株现蕾后,挑选长势一致无病虫害的植株,进行外源谷胱甘肽处理。

本试验设置了GSH、GSSG、BSO(索莱宝生物科技有限公司)3个处理,GSH和GSSG设置4个处理:5、25、45、65 mg·L⁻¹,BSO设置1个处理:25 mg·L⁻¹,以蒸馏水作为对照,试验采取随机区组设计。将大棚划分为10个小区,将各处理随机排列,每小区种植18株,6株为1次重复,每个处理共3次重复。处理期间于08:00开始喷施,以花球均匀布满液滴为准(每小区各喷施1200 mL),每隔3 d处理1次。共喷施7次,最后1次处理时,选取无病虫害的花球分时间点于0、3、6、12、24 h取样进行基因表达和生理分析,于48 h取样进行硫代葡萄糖苷含量分析及其他生理分析。取样时,用小刀从花茎基部将花球割下,再用剪刀将花蕾剪下并用锡箔纸包好后迅速放入液氮冷冻,保存-80℃冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 硫代葡萄糖苷含量测定 硫代葡萄糖苷含量检测参照已报道的方法^[25-26],并略做修改。称取0.1 g冷冻干燥样品,加入4 mL 70%甲醇和100 μ L Sinigrin(5 mmol·L⁻¹,内标)提取20 min,提取后,加入醋酸钡,8000 r·min⁻¹离心10 min。收集上清液,沉淀中加入70%甲醇重新提取,混合提取的上清

液。将提取液加入 DEAE Sephadex A 25 层析柱,液体流尽后加入硫酸酯酶,室温反应 16 h 后洗脱获得脱硫硫苷溶液。使用高效液相色谱法检测硫苷含量(*b*)并计算(以 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 表示)。

$$\text{硫苷含量}/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})= [\text{脱硫硫苷峰面积}\times\text{内标量}(\mu\text{mol})\times\text{脱硫硫苷响应因子}]/[\text{内标峰面积}\times\text{试样质量}(\text{g})]$$

1.2.2 半胱氨酸(Cys)含量和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -ECS)活性测定 采用索莱宝生物科技有限公司的试剂盒对半胱氨酸(Cys, BC0185)含量、 γ -ECS(BC1215)活性进行测量。

1.2.3 谷胱甘肽含量测定 采用索莱宝生物科技有限公司的试剂盒对谷胱甘肽(GSH, BC1175)含量

进行测定^[27-28]。

1.2.4 RNA 的提取及表达量的分析 采用 Steady Pure Plant RNA Extraction Kit 试剂盒(湖南艾科瑞)从青花菜花球中提取总 RNA。以不同处理的青花菜花球 RNA 为模板,按照 TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒(南京诺唯赞)用 1 μg 总 RNA 合成 cDNA。将 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 cDNA 样品使用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒(南京诺唯赞)制备 qPCR 反应溶液。实时荧光定量 PCR 分析根据青花菜目的基因的 cDNA 序列利用国家生物技术信息中心(NCBI)设计扩增基因序列的引物(表 1),引物由擎科生物科技有限公司合成。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法分析表达数据。

表 1 设计用于 RT-qPCR 分析的基因特异性引物序列
Table 1 Gene-specific primer sequences designed for RT-qPCR analysis

基因名称 Gene name	上游引物(5'-3') Forward primer sequence	下游引物(5'-3') Reverse primer sequence
<i>ACT1N</i>	GGAGCTGAGAGATTCCGTTG	GAACCACCACTGAGGACGAT
<i>GSTF11</i>	ACCAAGTATGCGGACCAAGG	GCTCTTCCACCAAAGCAACG
<i>GSTU20</i>	CGACTTCGAGTACAGGGACG	TTCTTGTGAGGCCACACCTC
<i>GGP1</i>	CGTTCGGAGACGAAGGAGAG	GGTGACCAAAGCAGATGCCA
<i>UGT74C1</i>	ACCACTCGTAGTCTCACCGA	CAGCCATGGTTAGTGAGAGT
<i>GSTF10</i>	GCTGTAGTGACGTTGGTGGA	GTCTGGTCCTTGCGATCTGT
<i>GSTF9</i>	CGTGGAGGCGACTACTTACC	GTAAACGGGAGGTGAGCCAA
<i>GSH1</i>	AGGGGAAGCAAAGCATTCTCA	CAATTCCCATCTCCTCAGCC
<i>GSH2</i>	GCAGTCCTCAGCAGTCAAAT	AAGATGATCCATTGTACCTCTCG

1.3 统计分析

采用 Microsoft Excel 整理所得数据并绘制表格和柱形图,利用 SPSS 20.0 统计软件对所有数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

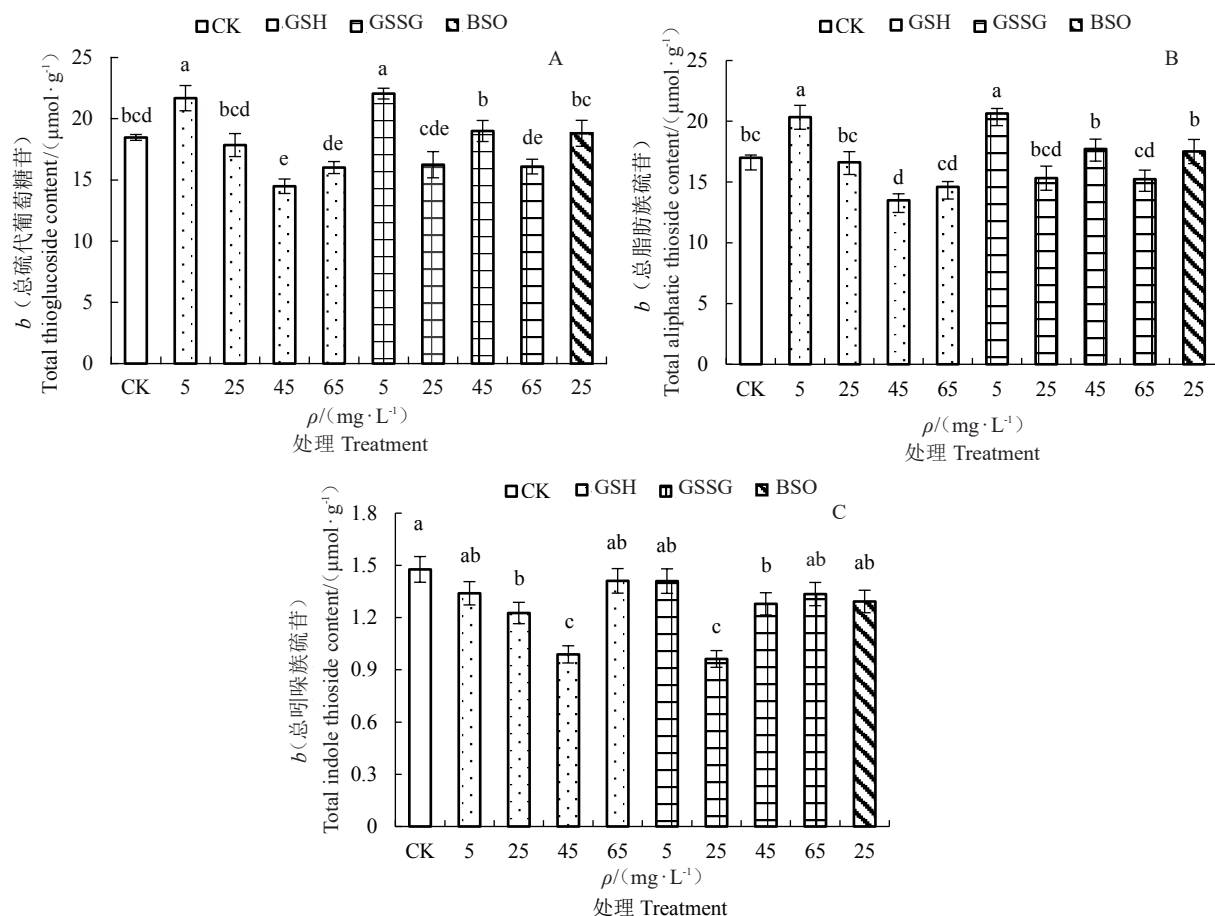
2.1 外源谷胱甘肽处理对青花菜花球中硫代葡萄糖苷含量的影响

采用高效液相色谱法共检测出 10 种硫苷,其中 6 种为脂肪族硫苷,4 种为吲哚族硫苷。由图 1-A 可以看出,与 CK 相比,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 和 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG 处理下总硫苷含量分别显著增加了 17.4%、19.4%。而 45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 处理下总硫苷含量与 CK 相比显著降低了 21.6%。其他各处理下总硫苷含量与 CK 相比则没有显著变化。

脂肪族硫苷是青花菜中最主要的硫苷种类。由图 1-B 可以看出,与 CK 相比,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 和 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG 处理下其含量分别显著提高

19.7%、21.5%。而 45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 处理使其含量与 CK 相比显著降低了 20.6%。在其他各处理下,脂肪族硫苷含量与 CK 相比则无显著变化。吲哚族硫苷是青花菜中含量较低的硫苷种类。由图 1-C 可以看出,GSH 处理下,吲哚族硫苷含量随处理浓度的升高呈先降低后升高的趋势,GSSG 处理下,吲哚族硫苷含量随处理浓度的升高呈先降低后升高的趋势。与对照 CK 相比,25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 和 45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 处理下吲哚族硫苷含量显著降低了 17.0%和 33.1%。与对照相比,25、45 和 65 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG 处理下吲哚硫苷含量分别显著下降 34.84%、13.40%、9.60%。25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BSO 处理下其含量则没有显著变化。

综上所述,与对照相比,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 处理下青花菜花球中总硫苷含量显著上升,45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 处理下总硫苷含量显著降低。与对照相比,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG 处理下,青花菜花球中总硫苷含量和脂肪族硫苷含量显著上升。结果表明,不同类型谷胱甘肽



注:不同小写字母表示处理间在 0.05 水平上差异显著。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at 0.05 level.

图1 外源还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)及谷胱甘肽抑制剂(BSO)处理对青花菜中硫代葡萄糖苷含量的影响

Fig. 1 Effects of exogenous glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), and glutathione inhibitor (BSO) treatments on the content of glucosinolates in broccoli

对青花菜花球中硫苷含量的影响基本相同,而不同浓度处理对青花菜花球中硫苷含量的影响不同,显示出谷胱甘肽对青花菜花球硫苷含量的影响具有浓度效应。基于这些结果,选取最佳处理质量浓度 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 和 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 的样品进行全参数分析。

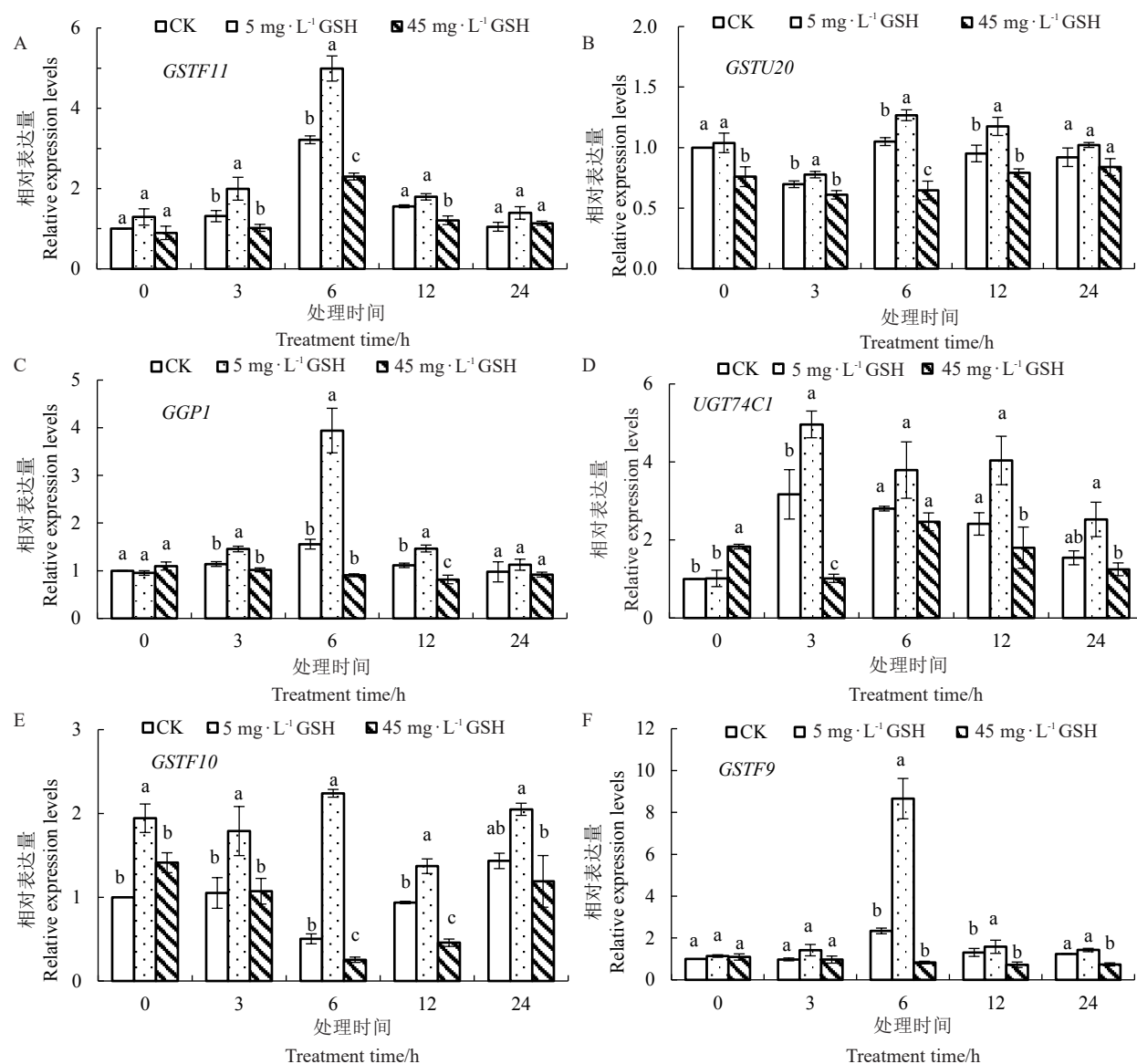
2.2 外源谷胱甘肽处理对青花菜花球中硫代葡萄糖苷合成相关基因表达的影响

通过 RT-qPCR 检测了 8 个硫苷合成相关基因的相对表达水平,了解外源谷胱甘肽处理后青花菜花球基因表达规律。由图 2 可知,与对照相比,在 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理后,青花菜花球中 *GSTF11*、*GSTU20*、*GGP1*、*UGT74C1*、*GSTF10*、*GSTF9* 的表达均得到了诱导,且除 *UGT74C1* 在 GSH 处理后 3 h 上调效果最显著外,其他基因在处理 6 h 上调效果最显著。与对照相比,在 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理后

GSTF11、*GSTU20*、*GGP1*、*UGT74C1*、*GSTF10*、*GSTF9* 的表达被抑制,其中 *GSTF11*、*GSTF10* 在 GSH 处理后 6 h 和 12 h 抑制效果显著,*GSTU20* 在 GSH 处理后 6 h 抑制效果显著。结果表明,与对照相比, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理能够有效诱导硫苷合成基因表达,而 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理对硫苷合成基因表达有显著抑制作用。

2.3 外源谷胱甘肽处理对青花菜花球中谷胱甘肽合成的影响

2.3.1 外源谷胱甘肽处理对青花菜花球中 *GSH1* 和 *GSH2* 基因表达的影响 分析 5、45 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 外源喷施处理下青花菜谷胱甘肽合成关键基因 *GSH1* 和 *GSH2* 在 24 h 内的表达情况。由图 3-A 可以看出,与对照相比,*GSH1* 的表达量在 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理后的 3 h 和 6 h 显著下调。与 CK 相比,处理后 3 h 分别下调了 51% 和 39%,处理



Note: Different lowercase letters for the same time treatment indicate significant differences at 0.05 level. The same below.

图 2 不同浓度外源 GSH 处理对青花菜硫代葡萄糖苷合成相关基因表达量的影响

Fig. 2 The influence of exogenous GSH treatment at different concentrations on the expression levels of genes related to glucosinolate synthesis in broccoli

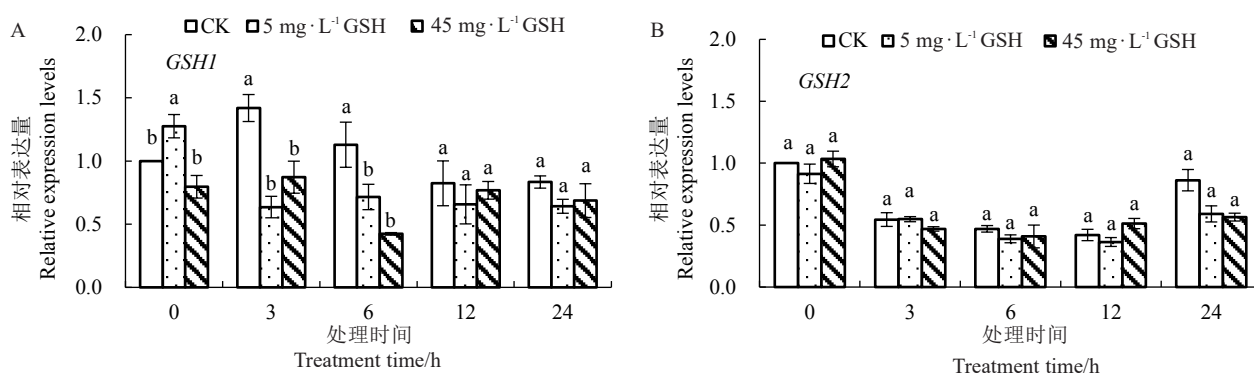


图 3 不同浓度外源 GSH 处理对青花菜谷胱甘肽合成相关基因表达量的影响

Fig. 3 The effects of different concentrations of exogenous GSH treatment on the expression levels of genes related to glutathione synthesis in broccoli

后 6 h 分别下调了 37% 和 62%。但 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理间 *GSH1* 的表达量在处理没有显著差异。与 CK 相比, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理下, *GSH2* 的表达量没有显著变化。结果表明, 外源喷施 GSH 处理对 *GSH1* 和 *GSH2* 表达没有显著影响。

2.3.2 外源谷胱甘肽处理对青花菜花球中 Cys 含量和 γ -ECS 活性的影响 Cys 是合成植物体内谷胱

甘肽的底物, γ -ECS 是植物体内谷胱甘肽合成途径中的关键酶。通过 GSH 对 γ -ECS 活性的反馈抑制, 调控 GSH 的生物合成量。由图 4-A 可以看出, 与 CK 相比, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理下 Cys 含量在 24 h 和 48 h 分别显著提高了 47% 和 36%; $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理下 Cys 含量在 3 h 至 48 h 内都显著积累, 且在 24 h 和 48 h 积累效果最明显, 与 CK 相比提高了 48% 和 51%。由图 4-B 可以看出, 不同浓度的

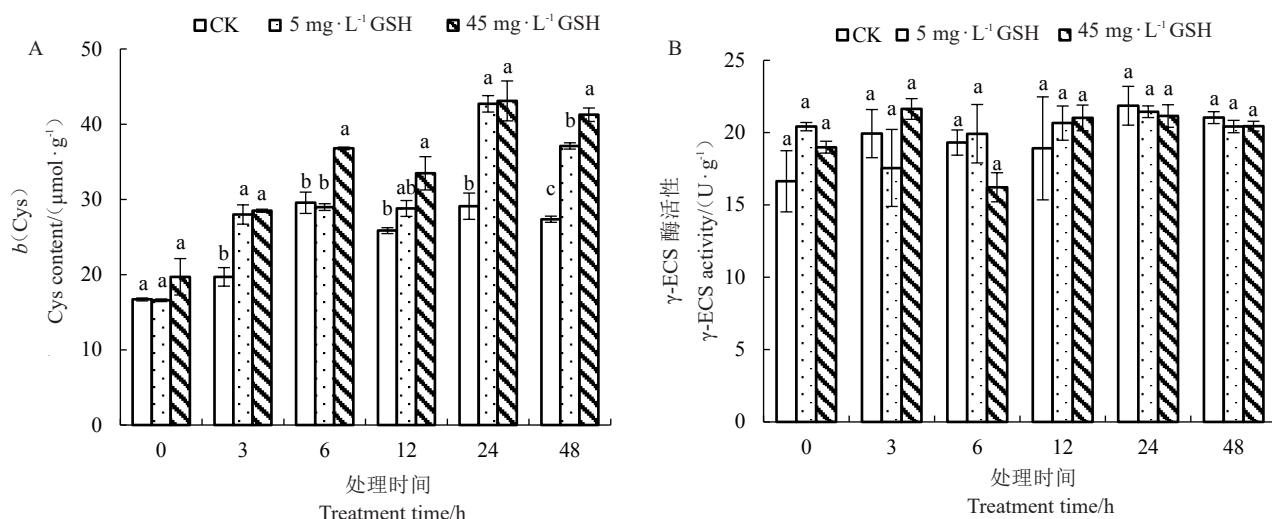


图 4 不同浓度外源 GSH 处理对青花菜半胱氨酸(Cys)含量和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -ECS)活性的影响

Fig. 4 The influence of exogenous GSH treatment at different concentrations on the content of Cysteine (Cys) and the activity of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) in broccoli

GSH 处理下 γ -ECS 活性无显著变化。由此可知, 外源喷施 GSH 显著提高了青花菜花球中 Cys 含量, 但是对 γ -ECS 活性则无显著影响。

2.3.3 外源谷胱甘肽处理对青花菜花球中 GSH 含量的影响 由图 5 可知, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理后的 6、12、24 h 青花菜花球中 GSH 含量均显著高于 CK, 而处理后 48 h 后 GSH 含量与 CK 相比没有显著差异。GSH 含量在 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 处理 6~48 h 内均显著高于 CK, 较 CK 相比分别提高了 1.28、0.77、1.11 和 0.54 倍。结果表明, 外源喷施 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 在 6~24 h 内显著增加了青花菜花球中谷胱甘肽含量, 外源喷施 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 在 6~48 h 内显著增加了其含量。

3 讨论与结论

硫代葡萄糖苷是十字花科植物富含硫的次生代谢物, 在植物防御和人体营养中具有重要的生物学和经济作用。谷胱甘肽与代谢物结合形成新的代谢物, 参与植物的代谢调节。许多研究表明, 谷胱甘肽作为还原性硫供体和活化醛肟偶联参与

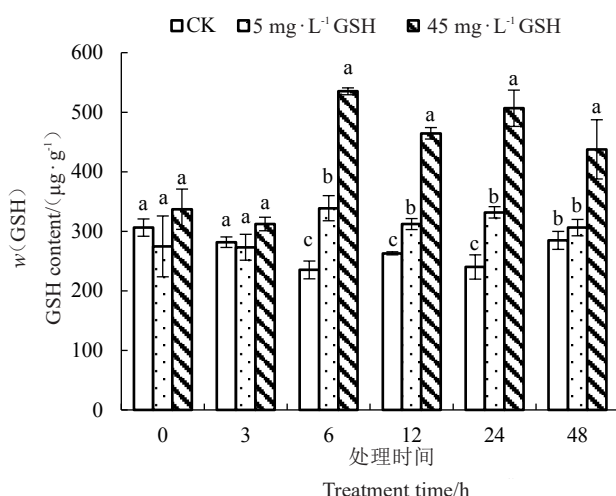


图 5 不同浓度外源 GSH 处理对青花菜中谷胱甘肽 (GSH) 含量的影响

Fig. 5 Effect of exogenous GSH at different concentrations on the content of glutathione (GSH) in broccoli

GSLs 生物合成。在非十字花科植物本氏烟草中发现 GSLs 部分的形成涉及 GSLs 偶联中间体, 该化合物由 γ -谷氨酰基肽酶(*GGPI*)代谢, 通过代谢积

累的谷胱甘肽偶联物显著促进硫代葡萄糖苷的产生^[29]。对突变体 *pad2* 和 *cad 2-1* 的分析中,两种突变体都比野生型植物含有更少的 GSH 和更多的 Cys,尽管硫苷含量不变,但这两个突变体在昆虫诱导下,吲哚型硫苷的含量下降^[30]。在笔者的试验中,通过 GSH 及 GSSG 处理,确定外源施用低浓度 GSH 和 GSSG 对 GSLs 生物合成具有积累效应,施用高浓度 GSH 对 GSLs 生物合成具有抑制作用,施用高浓度 GSSG 使 GSLs 含量略有下降,证实 GSH 参与 GSLs 的合成且依赖于相应的浓度。这可能是由于低浓度 GSH 使 GSLs 合成相关基因的表达上调导致 GSLs 含量显著积累,高浓度 GSH 使 GSLs 合成相关基因的表达下调导致 GSLs 含量显著下降。对 GSH 处理的拟南芥的分子分析中发现,与色氨酸和 GLS 生物合成途径相关的基因被谷胱甘肽显著上调,因此推断 GSH 诱导 GSLs 的生物合成^[31],这与笔者的试验结果相似。

低浓度 GSH 使 GSLs 合成相关基因的表达上调导致 GSLs 含量显著积累,高浓度 GSH 使 GSLs 合成相关基因的表达下调导致 GSLs 含量显著下降。这可能是由于青花菜花球吸收了外源施用的 GSH,并将其转运到细胞室中导致细胞内 GSH 及 Cys 含量升高,调节了 GSLs 合成相关基因表达从而介导了 GSLs 的生物合成。植物很容易吸收外源施加的谷胱甘肽,并将其转运到细胞室中,诱导一系列生理和生化过程,包括调节基因表达、细胞分裂、生殖生长发育和蛋白质活性^[32]。Cys 既是 GSH 的降解产物,也是代谢前体,作为 GSH 合成的前体,可以进一步转化为 Met 用于脂肪族 GSLs 的生物合成^[33-34]。GSH 运输到需要还原硫的器官后,部分 GSH 被降解为 Cys,以进一步结合到其他分子中,如蛋白质和辅酶^[32]。Cys 的吸收量明显高于 GSH 的吸收量,这种吸收速率的差异导致抑制硫酸盐摄取和转运所需的 Cys 浓度比引起同样抑制的 GSH 浓度低一个数量级^[35]。随着细胞内 GSH 浓度升高及降解 Cys 含量开始积累,高浓度的 Cys 可能抑制了硫酸盐摄取和转运,GSLs 合成基因的下调导致 GSLs 含量的下降。王丹^[36]研究报道,缺硫胁迫下小白菜叶片中的硫苷合成相关基因通过 25 mg·L⁻¹ GSH 进行叶面喷施而先上调后下调导致总硫苷含量下降同时显著增加了 GSH 和 Cys 含量,25 mg·L⁻¹ GSSG 处理虽然使大部分硫苷合成基因上调,但显著降低了总硫苷含量,增加了 GSH 及 Cys 含量;Sinha 等^[31]报道,胁迫状态下外源 GSH 处

理可以诱导硫苷合成关键基因的表达以及硫苷含量的上升;何超超^[37]报道,25 mg·L⁻¹ GSH 处理使小白菜叶片脂肪族和吲哚族合成相关基因表达下调,但对脂肪族和吲哚族硫苷含量没有影响,而 GSH、Cys 含量积累 *GSH1* 及初生硫代谢关键基因表达水平下降。25 mg·L⁻¹ GSSG 处理使小白菜叶片脂肪族和吲哚族合成相关基因表达上调,硫苷含量上升,Cys 含量短暂上升而后下降,初生硫代谢关键基因表达上调。这与本试验结果相似,但本研究中 GSH 合成关键基因 *GSH1* 及 *GSH2* 表达水平不受 GSH 处理影响。这可能是由于 *GSH1* 和 *GSH2* 由茉莉酸和重金属诱导^[33,38],对光和某些应激条件(如干旱和某些病原体)也有反应。但到目前为止,相对较差的条件被证明能显著诱导 *GSH1* 或 *GSH2* 转录。无论是外部施加的 H₂O₂ 还是细胞内产生的 H₂O₂,都不会导致拟南芥中 *GSH1* 或 *GSH2* 转录水平的升高,尽管在这些条件下谷胱甘肽的含量得到了显著提升^[33,39]。在本试验中,外源喷施不同浓度的 GSH 后,*GSH1* 和 *GSH2* 表达量没有发生变化, γ -ECS 酶活性同样没有变化。说明外源喷施 GSH 对 GSH 生物合成没有产生影响。

与对照相比,5 mg·L⁻¹ GSH 和 5 mg·L⁻¹ GSSG 处理后青花菜花球中 GSLs 含量显著积累,45 mg·L⁻¹ GSH 处理后 GSLs 被显著抑制。基于这些结果,选取最佳处理浓度 5 mg·L⁻¹ GSH 和 45 mg·L⁻¹ GSH 的样品进行全参数分析。结果表明,与对照相比,5 mg·L⁻¹ GSH 处理下,外源 GSH 诱导青花菜花球中 *GSTF11*、*GSTU20*、*GGP1*、*UGT74C1*、*GSTF10* 和 *GSTF9* 的表达上调,同时显著提高了花球中 GSH 和 Cys 的含量。与对照相比,45 mg·L⁻¹ GSH 处理下,外源 GSH 下调了青花菜花球中 *GSTF11*、*GSTU20*、*GGP1*、*UGT74C1*、*GSTF10* 和 *GSTF9* 的表达量,但显著提高了花球中 GSH 和 Cys 的含量。这说明,外源 GSH 通过处理浓度差异诱导和抑制基因表达对硫苷生物合成产生影响,低浓度 GSH 处理诱导硫苷合成基因表达,高浓度 GSH 处理抑制硫苷合成基因表达从而介导 GSLs 的合成。

参考文献

- [1] DOMÍNGUEZ-PERLES R, MARTÍNEZ-BALLESTA M C, CARVAJAL M, et al. Broccoli-derived by-products-a promising source of bioactive ingredients[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(4):383-392.
- [2] MAHN A, CASTILLO A. Potential of sulforaphane as a natural immune system enhancer: A review[J]. Molecules, 2021, 26(3): 752.

- [3] SUNDARAM M K, PREETHA R, HAQUE S, et al. Dietary isothiocyanates inhibit cancer progression by modulation of epigenome[C]. *Seminars in Cancer Biology*, 2022, 83: 353-376.
- [4] LI L Z, MA P H, NIRASAWA S, et al. Formation, immunomodulatory activities, and enhancement of glucosinolates and sulforaphane in broccoli sprouts: A review for maximizing the health benefits to human[J/OL]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023: 1-31 [2023-02-17]. DOI: 10.1080/10408398.2023.2181311.
- [5] RAO S Q, CHEN X Q, WANG K H, et al. Effect of short-term high temperature on the accumulation of glucosinolates in *Brassica rapa*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 161: 222-233.
- [6] 刘倩, 李敏, 田玉玲, 等. 硫代葡萄糖苷研究现状[J]. *农产品加工*, 2020(6): 86-88.
- [7] ESSOH A P, MONTEIRO F, PENA A R, et al. Exploring glucosinolates diversity in Brassicaceae: A genomic and chemical assessment for deciphering abiotic stress tolerance[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 150: 151-161.
- [8] HUANG X X, CHENG B, WANG Y Q, et al. Effects of fresh-cut and storage on glucosinolates profile using broccoli as a case study[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2023, 9(2): 285-292.
- [9] PETERSEN A, WANG C W, CROCOLL C, et al. Biotechnological approaches in glucosinolate production[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(12): 1231-1248.
- [10] SØNDERBY I E, GEU-FLORES F, HALKIER B A. Biosynthesis of glucosinolates - gene discovery and beyond[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5): 283-290.
- [11] HALKIER B A, GERSHENZON J. Biology and biochemistry of glucosinolates[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 303-333.
- [12] MIKKELSEN M D, HANSEN C H, WITTSTOCK U, et al. Cytochrome P450CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(43): 33712-33717.
- [13] CHEN S X, GLAWISCHNIG E, JØRGENSEN K, et al. CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2003, 33(5): 923-937.
- [14] ZHANG A Q, LUO R, LI J W, et al. *Arabidopsis* Glutathione-S-Transferases *GSTF11* and *GSTU20* function in aliphatic glucosinolate biosynthesis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 12: 816233.
- [15] PIŚLEWSKA-BEDNAREK M, NAKANO R T, HIRUMA K, et al. Glutathione transferase U13 functions in pathogen-triggered glucosinolate metabolism[J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(1): 538-551.
- [16] MIKKELSEN M D, NAUR P, HALKIER B A. *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis[J]. *Plant Journal*, 2004, 37(5): 770-777.
- [17] GRUBB C D, ZIPP B J, LUDWIG-MÜLLER J, et al. *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis[J]. *Plant Journal*, 2004, 40(6): 893-908.
- [18] GRUBB C D, ZIPP B J, KOPYCKI J, et al. Comparative analysis of *Arabidopsis* UGT74 glucosyltransferases reveals a special role of UGT74C1 in glucosinolate biosynthesis[J]. *Plant Journal*, 2014, 79(1): 92-105.
- [19] DI GIACOMO C, MALFA G A, TOMASELLO B, et al. Natural compounds and glutathione: Beyond mere antioxidants[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(7): 1445.
- [20] 汪宽鸿, 祝彪, 朱祝军. GSH/GSSG 在植物应对非生物胁迫中的作用综述[J]. *园艺学报*, 2021, 48(4): 647-660.
- [21] HASANUZZAMAN M, BHUYAN M H M B, ANEE T I, et al. Regulation of *Ascorbate-glutathione* pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(9): 384.
- [22] NOCTOR G, MHAMDI A, CHAOUCH S, et al. Glutathione in plants: An integrated overview[J]. *Plant Cell & Environment*, 2012, 35(2): 454-484.
- [23] MITREITER S, GIGOLASHVILI T. Regulation of glucosinolate biosynthesis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(1): 70-91.
- [24] ZHU B A, WANG K H, LIANG Z L, et al. Transcriptome analysis of glutathione response: RNA-Seq provides insights into balance between antioxidant response and glucosinolate metabolism[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(7): 1322.
- [25] MATTHÄUS B, LUFTMANN H. Glucosinolates in members of the family brassicaceae: Separation and identification by LC/ESI-MS-MS[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(6): 2234-2239.
- [26] SHI H M, ZHAO Y, SUN J H, et al. Chemical profiling of glucosinolates in cruciferous vegetables-based dietary supplements using ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem high resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2017, 61: 67-72.
- [27] ALPERT A J, GILBERT H F. Detection of oxidized and reduced glutathione with a recycling postcolumn reaction[J]. *Analytical Biochemistry*, 1985, 144(2): 553-562.
- [28] OWENS C W I, BELCHER R V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione[J]. *Biochemical Journal*, 1965, 94(3): 705.
- [29] COBBETT C S, MAY M J, HOWDEN R, et al. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase[J]. *Plant Journal*, 1998, 16(1): 73-78.
- [30] SCHLAEPI K, BODENHAUSEN N, BUCHALA A, et al. The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*[J]. *The Plant Journal*, 2008, 55(5): 774-786.
- [31] SINHA R, KUMAR D, DATTA R, et al. Integrated transcriptom-

- ic and proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* exposed to glutathione unravels its role in plant defense[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, 120(3):975-988.
- [32] XIANG C B, OLIVER D J. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1998, 10(9):1539-1550.
- [33] AARABI F, KUSAJIMA M, TOHGE T, et al. Sulfur deficiency-induced repressor proteins optimize glucosinolate biosynthesis in plants[J]. *Science Advances*, 2016, 2(10):e1601087.
- [34] AHMAD N, MALAGOLI M, WIRTZ M, et al. Drought stress in maize causes differential acclimation responses of glutathione and sulfur metabolism in leaves and roots[J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(247):1471-2229.
- [35] HERSCHBACH C, RENNENBERG H. Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1994, 45(277):1069-1076.
- [36] 王丹. 外源谷胱甘肽对缺硫胁迫下小白菜硫代葡萄糖苷生物合成的影响[D]. 杭州:浙江农林大学, 2019.
- [37] 何超超. 外源谷胱甘肽对小白菜硫代葡萄糖苷生物合成影响的初步研究[D]. 杭州:浙江农林大学, 2018.
- [38] SUNG D Y, KIM T H, KOMIVES E A, et al. ARS5 is a component of the 26S proteasome complex, and negatively regulates thiol biosynthesis and arsenic tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2009, 59(5):802-813.
- [39] QUEVAL G, THOMINET D, VANACKER H, et al. H₂O₂-activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast[J]. *Molecular Plant*, 2009, 2(2):344-356.